Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. Meerwein)

Zur Kenntnis des Calotoxins

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Philosophischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Leon John Heuser
aus Newark, U.S.A.

Marburg (D 4) 1939

Druck: Hessischer Verlag Karl Euker, Marburg/Lahn

Als Dissertation angenommen am 21. September 1939.

Berichterstatter: Dr. Hesse.

Mitberichterstatter: Professor Dr. Meerwein.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 1939

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

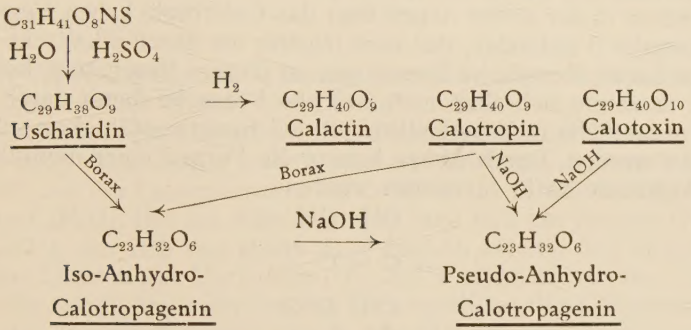
Meinen Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547922_0155

Aus dem Milchsaft von Calotropisarten, strauchähnlichen Gehölzen aller tropischen Gebiete der Welt, deren ursprüngliche Heimat Afrika ist, wird eines der stärksten Pfeilgifte zubereitet. Der Saft enthält in der Tat eine ganze Reihe von Herzgiften, die in Art und Stärke der Wirkung dem berühmten Strophantin gleichen.

Bisher sind drei Stoffe einwandfrei charakterisiert worden, das Uscharin $C_{31}H_{41}O_8NS$, das Calactin $C_{29}H_{40}O_9$ und das Calotoxin $C_{29}H_{40}O_{10}$: zu ihnen kommt als Prototyp der ganzen Gruppe das Calotropin $C_{29}H_{40}O_9$, das zwar nicht aus dem Milchsaft, aber aus den getrockneten Blättern und Stengeln von Calotropis procera kristallisiert erhalten wurde. Die überaus nahen Zusammenhänge der vier Stoffe, soweit sie bis jetzt bekannt sind, werden in folgendem Schema deutlich:



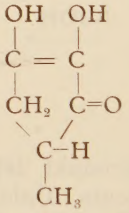
Das gemeinsame Abbauprodukt ist ein Lakton $C_{23}H_{32}O_6$, das Pseudo-anhydro-calotropagenin. Calotropin und Calotoxin sind direkt, Uscharin über zwei Zwischenstufen indirekt in dieses Endprodukt überführt worden, während Calactin durch Hydrierung des Uscharidins erhalten werden konnte und hierdurch ebenso sicher als ein Derivat des gleichen Grundkörpers gekennzeichnet worden ist.

Dem Beweis dieser Zusammenhänge haftete der Schönheitsfehler an, daß das Calotoxin nur durch die Spaltung mit Lauge seinen Anschluß gefunden hat; hierbei sind erstens ziemlich erhebliche Umlagerungen im Grundgerüst denkbar, zweitens aber ist das Pseudogenin viel schlechter charakterisiert als das Iso-genin, das durch milde Einwirkung von Boraxlösung aus Calotropin und Uscharidin erhalten werden kann. Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit die Methode der Boraxspaltung auf das Calotoxin übertragen und erwartungsgemäß nun das Iso-anhydro-calotropagenin erhalten, das den Mischschmelzpunkt mit einem Präparat aus Calotropin hielt, mit dem Pseudogenin dagegen eine starke Depression gab. Durch diese doppelte Verknüpfung glauben wir mit Sicherheit auch für Calotoxin

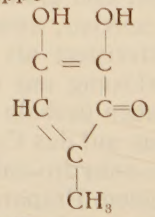
den nahen Zusammenhang mit den anderen Calotropisgiften bewiesen zu haben.

Bei der erwähnten Spaltung konnten wir als flüchtiges Spaltstück Acetaldehyd isolieren. Es ist bisher nicht klar, aus welchem Teil des Moleküles er entstanden ist, und man kann keine Schlüsse daraus ziehen; immerhin sei darauf hingewiesen, daß er auch bei alkalischen Spaltungen des Calactins erhalten wird, was wieder für die Ähnlichkeit aller dieser Stoffe spricht.

Außer dem Grundkörper mit 23-Kohlenstoffatomen ist den Calotropisgiften eine Gruppe gemeinsam, die sechs Kohlenstoffatome umfaßt und bei den alkalischen Spaltungen abgetrennt wird. In ihr konzentriert sich offenbar die Verschiedenheit der Stoffe, denn die C-23-Bruchstücke aus der Boraxspaltung sind ja identisch, nicht bloß isomer. Schon in der ersten Arbeit über das Calotropin haben *Hesse* und *Reicheneder*[1]) gefunden, daß man leichter als durch alkalische Spaltungen durch thermische Zersetzung zu diesem Bruchstück kommen kann; es zeigte sich aber auch, daß alle Versuche damit durch seine außerordentliche Luftempfindlichkeit und Reaktionsfähigkeit sehr erschwert werden. Durch Abbau konnte die Formel einer methylierten Reduktinsäure dafür festgelegt werden:

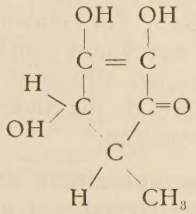


Man erhält die Methylreduktinsäure sowohl aus Calotropin wie aus Calactin; auch alle Hydrierungsprodukte des Uscharidins (dieses nimmt ein und drei Mol Wasserstoff auf) geben sie, nicht aber Uscharidin selbst. Hieraus muß man schließen, daß im Uscharidin eine weitere Doppelbindung im 5-ring liegt, die den Rest allzu labil zur Isolierung macht, aber bei der Hydrierung als erste verschwindet. Im Uscharidin ist also die Gruppe



enthalten. Die Differenz der Formeln von Uscharidin und Calactin im Wasserstoffgehalt findet hiermit ihre Begründung.

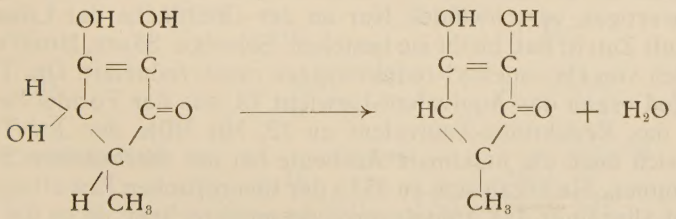
Die Calotoxinformel, die erst in dieser Arbeit auf Grund neuer Reinigungsmethoden und Analysen sicher begründet wird, hat ein Molekül Wasser mehr als Uscharidin. Hierauf wurde schon früher die Vermutung gegründet, daß sie einen sauerstoffreicheren Reduktinsäurering etwa von der Struktur



enthalten müsse.

Der Beweis dieser Anschauung begegnet allen Schwierigkeiten, die schon bei der Methylreduktinsäure auftraten — vermehrt durch die Kostbarkeit des Calotoxins und die mäßigen Ausbeuten am fraglichen Spaltstück. Bisher war es auch nur gelungen, die Bruttoformel indirekt aus der Zusammensetzung des Osazons abzuleiten; sie ergab sich zu $C_6H_8O_4$. Bei der Alkalispaltung fand sich ein zweites Osazon (Zp. 227°), das sich von einem Stoff $C_6H_6O_3$ ableitet und tatsächlich mit dem Osazon aus Uscharidin (Zp. 235°) identisch zu sein scheint. Dasselbe wurde nun auch aus der Boraxspaltung des Calotoxins isoliert; der Zersetzungspunkt betrug 225–230°. Die kleine Differenz der Zersetzungspunkte findet ihren Grund leicht darin, daß sie sehr von der Art des Erhitzens abhängen und die vorliegenden Bestimmungen von verschiedenen Bearbeitern und an verschiedenen Schmelzpunktapparaten durchgeführt wurden.

Es ist also andeutungsweise schon die wichtige Umwandlung des Calotoxinspaltstückes in dasjenige des Uscharidins gelungen:



Zur Reindarstellung des Calotoxinspaltstückes selbst — das wir fortan Oxy-methyl-reduktinsäure nennen — kann auch beim Calotoxin die thermische Zersetzung dienen. Aber hierbei findet schon die

Wasserabspaltung teilweise statt: *Eysenbach**) hat in dem Destillat ein Osazon nachgewiesen, das wir trotz seiner unvollkommenen Reinheit jetzt als das erwähnte Osazon der Anhydro-oxy-methyl-reduktinsäure deuten können. Vor allem ist es uns gelungen, das gleichzeitig entstehende Wasser durch tiefe Kühlung mit Kohlensäureeis zu kondensieren und an der blauen Färbung von wasserfreiem Kupfersulfat qualitativ nachzuweisen. Zur einwandfreien Identifizierung wurde das Kondensat mit Phenylcyanat zum Diphenylharnstoff umgesetzt und mit einem synthetischen Präparat verglichen. Das Wasser stammt nicht aus dem C_{23}-Kern, da die anderen Gifte unter den gleichen Bedingungen keines abspalten.

Das Ausmaß dieser Wasserabspaltung ist bei verschiedenen Versuchen sehr schwankend. Der Grund war uns lange rätselhaft. Allmählich hat es sich herausgestellt, daß manche Präparate bei der Analyse erhebliche Rückstände gaben, obwohl sie mit aller Sorgfalt umkristallisiert waren. Diese Rückstände sind fraglos Spuren von Aluminiumoxyd, die aus der chromatographischen Reinigung stammen. Nun ist Aluminiumoxyd bekanntlich ein ausgezeichneter Katalysator für Wasserabspaltungen, also auch für die beobachtete Nebenreaktion.

In Fällen, in denen die Wasserabspaltung geringfügig bleibt, kristallisiert das Destillat der Vakuumdestillation bald nach dem Erkalten. Es läßt sich unter Luft-Ausschluß aus einem Äther-Petroläther-Gemisch oder noch besser aus reinem Benzol umkristallisieren. Dabei erhält man die reine Oxy-methyl-reduktinsäure in farblosen langen Kristallnadeln vom Schmelzp. 104° (Block). Die Analyse stimmt ausgezeichnet auf die erwartete Formel $C_6H_8O_4$, die Kristalle und noch mehr die Lösung sind luftempfindlich, allerdings schwächer als Methylreduktinsäure. Die kristallisierte Substanz gibt die Reaktionen, die für das rohe Destillat beschrieben wurden[2]). Besonders charakteristisch ist die permanganatähnliche Färbung mit Eisenchlorid, die nach einiger Zeit durch Reduktion des dreiwertigen Eisens zum zweiwertigen verschwindet. Nur an der Oberfläche der Lösung, wo die Luft Zutritt hat, bleibt sie bestehen. Selenige Säure, Brom und Jod werden von Oxy-methyl-reduktinsäure rasch reduziert. Die Titration mit Jod ergab das Äquivalent-Gewicht 73, aus der Formel berechnet man das Reduktions-Äquivalent zu 72. Mit Hilfe der Jod-Titration läßt sich auch die maximale Ausbeute bei der thermischen Spaltung bestimmen. Sie ergab sich zu 35% der theoretischen Erwartung. Hierbei ist allerdings das Anhydroprodukt mitberechnet, da es die Endiol-

---

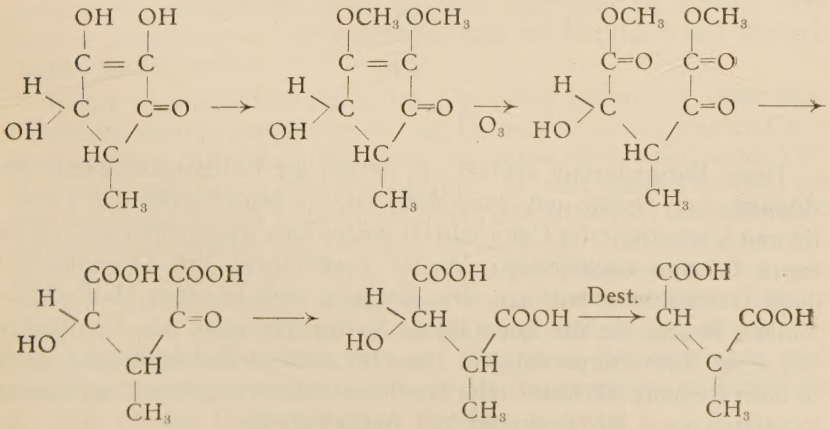
*) Journal H. Eysenbach.

gruppe noch enthält. Wir glauben aber nach den Erfahrungen bei Uscharidin, daß höchstens Spuren dieser empfindlichen Substanz die Destillation überstanden haben.

Oxy-methyl-reduktinsäure enthält saure Wasserstoffatome. Dies folgt sowohl aus der kongosauren Reaktion wie aus dem Verhalten gegen Diazomethan. Vermischt man die Ätherlösung der Säure mit einer ätherischen Diazomethanlösung, dann tritt sofort kräftige Stickstoffentwicklung und Entfärbung ein. Das Reaktionsprodukt kristallisierte nicht. Es gibt eine grüne Eisenchloridreaktion entsprechend einer noch vorhandener Enolgruppe und reduziert nicht mehr. Bei langer Einwirkung von Diazomethan verschwindet die Farbreaktion. Offenbar ist dann auch die zweite Hydroxylgruppe methyliert worden. Merkwürdigerweise hat Oxy-methyl-reduktinsäure bei der Titration in wäßriger Lösung kaum Lauge verbraucht. Zur Wiederholung des Versuchs hat das Material uns gefehlt. Vermutlich ist in alkalischer Lösung die Sauerstoffempfindlichkeit so groß, daß das Aufblasen von Bombenstickstoff in diesem Fall keinen ausreichenden Schutz bietet.

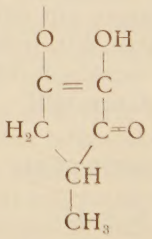
Genau wie Methylreduktinsäure läßt sich auch das Spaltstück des Calotoxins in schwefelsaurer Lösung mit Phloroglucin kondensieren. Dabei wird gleichzeitig Wasser abgespalten. Die Reaktion beweist wieder das Vorhandensein einer Carbonylgruppe in der Oxy-methyl-Reduktinsäure.

Bisher haben alle Reaktionen mit der reinen Säure die angenommene Strukturformel gestützt. Wir haben nun versucht, sie durch einen oxydativen Abbau zu beweisen. Die beabsichtigten Reaktionen sind in folgenden Formeln dargestellt:

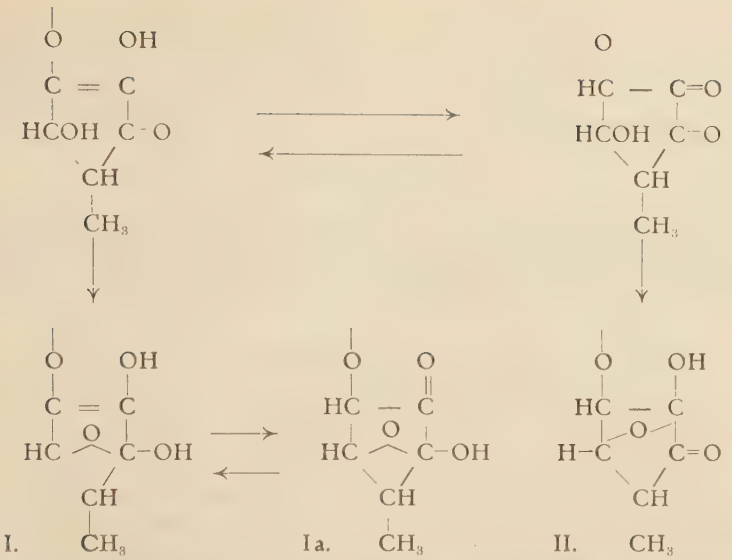


Das Kernstück ist die Spaltung durch Ozon. Damit aber die Doppelbindung zwischen den enolischen Hydroxylgruppen, die aufgespalten werden soll, nicht durch Autoxydation verlorengeht, mußten wir den Ester verwenden. Nach der Ozonisation wurde der Dicarbonsäureester verseift und nach der Reaktion von Boeseken mit Wasserstoffsuperoxyd decarboxyliert. Die erwartete Citramalsäure ist sehr schwer zu isolieren. Sie wurde deshalb destilliert, um durch Wasserabspaltung zur Citraconsäure zu kommen. Der Abbau, für den nur 0,9 g Calotoxin entsprechend etwa 60 mg Oxy-methyl-Reduktinsäure zur Verfügung standen, verlief programmgemäß. Beim Stehen des Destillats kristallisierte eine kleine Menge feiner Nadeln aus, die von der Mutterlauge abgepreßt wurden und dann bei etwa 95° schmolzen. Reine Citraconsäure schmilzt bei 91°. Zu einem eingehenden Vergleich war die Menge unseres Abbauprodukts zu gering: wir können also nur sagen, daß wir höchstwahrscheinlich Citraconsäure aus Oxymethyl-Reduktinsäure erhalten haben.

Als Typus der Verknüpfung nehmen wir in den Calotropisgiften die Verätherung des einen enolischen Hydroxyls mit einer alkoholischen Gruppe des Kerns an:



Diese Formulierung erklärt am besten die Luftbeständigkeit, die Bildung eines Oxims und eines Methyläthers beim Calotropin, Calactin und Uscharidin. Im Calotoxin ist weder eine Ketogruppe noch eine saure Gruppe nachweisbar. Weder Verätherung mit Diazomethan noch Oximbildung tritt ein. Die Ursache muß in einer Halbacetalbildung liegen, die die überzählige Hydroxylgruppe des Calotoxins mit einer Ketogruppe eingeht. Die Oxy-methyl-Reduktinsäure kann in ihrer Bindung als Keto- oder Enolform reagieren; dementsprechend existieren zwei Möglichkeiten zur Acetalbildung:



Hierdurch verschwindet sowohl eine Ketogruppe als auch die enolische Hydroxylgruppe — auch im Fall I, denn nach Verschwinden der Ketogruppe ist das Enol nicht mehr beständig und lagert sich in Ia um. Daß die verbliebene Ketogruppe nicht mit Hydroxylamin reagiert, beruht jedenfalls auf sterischer Hinderung; sie tut es ja auch nicht bei den anderen Giften.

Anzeichen für eine solche Maskierung des reduzierenden Systems sind übrigens schon bei der freien Oxy-methyl-Reduktinsäure vorhanden. Die beschriebenen Farbreaktionen treten nämlich nicht momentan ein, sondern mit einer gewissen Verzögerung. Ebenso geht hierauf die geringere Luftempfindlichkeit im Vergleich zur Methylreduktinsäure zurück.

In den Eigenschaften des Calotoxins selbst äußert sich diese Acetalbildung noch in zweifacher Weise. Erstens ist es das einzige Calotropisgift mit 29 Kohlenstoffatomen, das keine stöchiometrischen Verbindungen mit Lösungsmitteln eingeht. Es teilt diese Eigenart mit dem Uscharin, dessen Ketogruppe durch den stickstoff- und schwefelhaltigen Rest besetzt ist. Zweitens ist auch das Calotoxin sehr resistent gegen Säuren. Man kann es bei tiefer Temperatur in konzentrierter Salzsäure auflösen und eine Viertelstunde in dieser Lösung stehen lassen, ohne daß es verändert wird. Selbst Kochen mit 1N-Schwefelsäure spaltet kein Wasser ab. Diese Erscheinungen sind nicht zu erwarten, wenn eine freie Hydroxylgruppe in β-Stellung zu einer offenen Carbonylgruppe stände.

Die katalytische Hydrierung des Calotoxins verbraucht zwei Mol Wasserstoff, wovon eines auf den Rest der Oxy-methyl-Reduktinsäure und das zweite auf den Enol-lacton-Ring des Grundkörpers entfallen dürfte. Der Befund stimmt mit dem bei Uscharidin überein, das zur vollständigen Hydrierung drei Mol Wasserstoff verbraucht, entsprechend seiner zweiten Doppelbindung im Reduktinsäurerest.

Aus dem Rückstand der thermischen Zersetzung konnte trotz vieler Versuche kein kristallisierter Stoff erhalten werden. Wir haben in erster Linie erwartet, Calotropagenin daraus isolieren zu können:

$$\underset{\text{Calotropin}}{C_{29}H_{40}O_9} \longrightarrow \underset{\text{Calotropagenin}}{C_{23}H_{32}O_6} + C_6H_8O_3$$

$$\underset{\text{Calotoxin}}{C_{29}H_{40}O_{10}} \longrightarrow \underset{\text{Calotropagenin}}{C_{23}H_{32}O_6} + C_6H_8O_4$$

Aber Calotoxin bedarf zur Spaltung einer Temperatur, die um mindestens 25° höher liegt als bei Calotropin. Diese Differenz führt natürlich zu einer stärkeren Zersetzung des Rückstandes. Überdies ist bei Calotoxin eine zweite Reaktion möglich, die bei Calotropin nicht eintreten kann, nämlich die Abspaltung von Wasser zu Uscharidin. Wir haben in der Tat durch Umlösen Gemische bekommen, deren Zersetzungspunkt (280–290°) viel höher lag als der von Calotoxin und Calotropagenin, und sehr nahe an den Wert von Uscharidin herankam (290°). Die Abtrennung des Uscharidins — falls es wirklich entsteht — muß sich über das Oxim erreichen lassen, da die beiden anderen Stoffe keine Oxime geben.

Nach diesen vergeblichen Bemühungen haben wir die Rückstände der Brenzreaktionen gesammelt, um durch eine Selendehydrierung womöglich näheren Aufschluß über den Grundkörper aller Calotropisgifte zu erhalten. Dabei wurden drei kristallisierte Kohlenwasserstoffe isoliert und ihre Absorptionsspektren im ultravioletten Gebiet aufgenommen. Es ergab sich, daß weder Chrysen noch Methyl-cyclopenteno-phenanthren darunter waren. Beide wurden aus Cholesterin nach der angewandten Methode leicht erhalten (*W. Thomas*). Nur eines der drei Spektren war dem der genannten Stoffe ähnlich und läßt auf ein höher kondensiertes aromatisches System schließen. Die beiden anderen gaben im kritischen Gebiet überhaupt keine wesentliche Absorption; sie könnten hydro-aromatischen Stoffen zugehören.

Allen bisherigen Untersuchungen dieser Reihe hat die Arbeitshypothese zugrunde gelegen, daß auch in den Calotropisgeninen das Ringsystem der bekannten übrigen Herzgifte vorliegt. Sie ist durch unseren negativen Befund zwar nicht widerlegt, aber schwer erschüt-

tert. Denn wo man in den Herzgiften bisher gesucht hat, hat man wenigstens einen der beiden Stoffe gefunden. *Jacobs*[3]) hat aus Strophantin und *Tschesche*[4]) aus Uzarigenin das Methyl-cyclo-pentenophenanthren isoliert.

Versuchsteil

Die Aufarbeitung der Calotropis-Milch ist diesmal nach einer anderen Methode erfolgt als bisher. Daher mußte auch für das Calotoxin ein neues Darstellungsverfahren ausgearbeitet werden. Der Hergang ist kurz folgender:

Die Milch wird nach Zusatz von Ammoniumsulfat durch 20% Alkohol koaguliert. Die Fällung wird dann abgesaugt und mit etwas Alkohol nachgewaschen. Die Salzlauge besteht aus zwei Schichten, einer unteren wäßrigen Ammoniumsulfat-Lösung und einer oberen alkoholischen Schicht, die das Calotoxin enthält. Die Alkohol-Schicht wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit Chloroform ausgeschüttelt und das Chloroform auf 800 ccm eingeengt; es enthielt etwa 3 kg Substanz. Die dickflüssige Lösung wird unter Rühren in 6 l Benzin eingegossen. Die Substanz fällt schmierig, wird aber beim Durchkneten und Stehen langsam krümlig. Das abfiltrierte Material, das wir „Alkoholkonzentrat" nennen, wog 2100 g.

1500 g „Alkoholkonzentrat" werden in 3000 ccm absolutem Alkohol unter Erwärmen gelöst und mit der Lösung von 600 g Bleiacetat in 1 l Wasser gefällt. Wasserzusatz (3500 ccm) fällt weitere Mengen von Verunreinigungen aus. Nach Filtrieren durch ein Faltenfilter wird in die Lösung zweimal Schwefelwasserstoff eingeleitet und vom Bleisulfid jedesmal abfiltriert. Die Lösung wird dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, der Rückstand getrocknet und mit absolutem Alkohol aufgenommen. Die trübe Lösung wird heiß filtriert. Nach dem Erkalten scheidet sich das unreine Calotoxin aus. Ausbeute etwa 80 g.

Es wurde auch versucht, Calotoxin aus der Aluminiumoxyd-Säule, die zur Aufarbeitung des Uscharidins gebraucht wurde, zu gewinnen, aber dies ist uns nicht gelungen.

Reinigung des Calotoxins.

Zur Reinigung des Calotoxins haben *Hesse, Reicheneder* und *Eysenbach*[2]) ein Alkohol-Chloroform-Wasser-Gemisch gebraucht, da Calotoxin in allen reinen Lösungsmitteln sehr schwer löslich ist. Wir haben es nur bei der ersten Umkristallisation vorteilhaft gefunden, das Calotoxin in diesem Gemisch zu lösen, durch ganz wenig

Aluminiumoxyd zu filtrieren und dann das Chloroform im Vakuum einzudampfen. Dabei kristillisiert das Calotoxin schon farblos aus. Aber selbst nach häufiger Wiederholung werden die Kristalle nicht ganz einheitlich und die Kohlenstoff-Werte der Analysen liegen zu tief. Wir sind daher für die Endreinigung zu den reinen Lösungsmitteln zurückgekehrt und haben am Heißextraktor umkristallisiert. Sowohl aus Alkohol wie Aceton erhält man farblose Stäbchen, die bei guten Präparaten vollkommen einheitlich sind.

Der Zersetzungspunkt des Calotoxins (238°) ist unabhängig vom Umkristallisations-Medium; er hängt aber etwas von der Art des Erhitzens ab.

Calotoxin aus Aceton gibt ohne weiteres die richtigen Analysen-Werte. Präparate, die aus Alkohol oder wasserhaltigen Lösungsmitteln auskristallisiert wurden, liegen im Kohlenstoff-Wert trotz gleicher Reinheit immer noch etwas zu tief. Spuren dieser Lösungsmittels bleiben stets adsorbiert oder eingeschlossen und können auch durch Trocknen im Hochvakuum nicht ohne Zersetzung der Substanz entfernt werden. Dies gelingt aber beim Kochen in hochsiedenden Lösungsmitteln, z. B. Xylol oder Tetralin (letzte Analyse). Der Zersetzungspunkt bleibt hierbei 238°.

Zur Analyse wurden die späteren Proben aus Aceton am Extraktor umkristallisiert. Die ersten zwei sind aus dem Gemisch umkristallisiert. Die erste ist die beste frühere Analyse[2]). Alle sind bei 140° im HV über P_2O_5 getr., der Gewichtsverlust ist stets gering (keine stöchiometrische Lösungsmittel-Verbindung):

4,551; 4,960; 4,853; 5,116; 4,942 mg Subst.
10,529; 11,460; 11,275; 11,900; 11,440 mg CO_2
2,969; 3,350; 3,330; 3,410; 3,360 mg H_2O

$C_{29}H_{40}O_{10}$ (548.3)	Ber. C	63,46	H 7,35
	Gef. C	63,10	H 7,30
		63,00	7,38
		63,36	7,68
		63,43	7,46
		63,13	7,55

Das getrocknete Calotoxin zieht aus feuchter Luft Wasser an, ohne jedoch in absehbarer Zeit ein volles Mol zu erreichen. 67,7 mg Calotoxin nahmen in drei Tagen 0,9 mg auf (Ber. 2,2 mg).

4,807 mg Subst., 11,075 mg CO_2, 3,240 mg H_2O

$C_{29}H_{40}O_{10} \cdot H_2O$ (566,3)	Ber. C	61,45	H 7,47
	Gef. C	62,83	H 7,54

Boraxspaltung.

Methode von Hesse und Reicheneder[1])

2,0 g Calotoxin wurden mit 20 ccm 20%iger wäßriger Boraxlösung im Stickstoffstrom 40 Stunden unter Rückfluß gekocht, wobei das Calotoxin allmählich in Lösung geht. Nach dem Erkalten wurde mit 2N-Salzsäure angesäuert und nach 12stündigem Stehen abfiltriert.

Isogenin: Der abfiltrierte Niederschlag wurde zweimal in Wasser suspendiert, um mitausgeschiedene Borsäure zu entfernen. Dann wurde er in absolutem Alkohol gelöst und durch eine kurze Schicht Aluminiumoxyd filtriert. Nach mehrfachem Umkristallisieren wurden feine weiße Nadeln (Zersp. 429–252°) erhalten. Ein Mischschmelzpunkt mit dem Isogenin des Uscharidins gab keine Depression. Im Gemisch mit dem Pseudo-Anhydro-Calotropagenin aus der Alkalispaltung (242–246°) lag er bei 228–233°.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 140° im HV über P_2O_5 getrocknet:

3,865 mg Subst., 9,605 mg CO_2, 2,840 mg H_2O
$C_{23}H_{32}O_6$ (404) Ber. C 68,31 H 7,98
Gef. C 67,80 H 8,14

Filtrat: Das Filtrat von dem abfiltrierten Genin wurde zwei Stunden mit Äther extrahiert; beim Einengen schied sich 70,7 mg gelbe, halbkristallinische Substanz aus. Vermutlich mußte hier die Oxymethylreduktinsäure zu finden sein, aber da diese Substanz keine Reaktion mit neutraler Silbernitrat- oder Ferrichlorid-Lösung gab, schien dieses nicht der Fall. Jedoch reduziert die Substanz ammoniakalische Silbernitrat-Lösung. Wegen der Schwierigkeit bei der Umkristallisation wurde das Dinitrophenylhydrazin-Derivat gemacht. Eine chromatographische Analyse zeigte mindestens vier verschiedene Zonen. Aus diesen konnte ein Präparat von Zersetzungsp. 225 bis 230° gewonnen werden, das eine Schmelzpunktserniedrigung mit dem Derivat der Oxy-methyl-Reduktinsäure aus der Hochvakuum-Spaltung (248°) gab. Es scheint aber identisch zu sein mit dem Osazon aus Uscharidin (Zersp. 230–235°).

Flüchtiger Teil: Aus dem flüchtigen Teil der Boraxspaltung konnten wir ein anderes Dinitrophenylhydrazon isolieren, das sich nach dem Umkristallisieren aus Alkohol in gold-braunen Nadeln (8,0 mg) von Schmp. 159–165° erhalten läßt. Da das Derivat des Acetaldehyds einen ähnlichen Schmelzpunkt besitzt, haben wir dieses Derivat gemacht und fanden, daß es bei 156–161° im Kupferblock schmilzt.

Die Substanz wurde bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet. Sie reichte nicht für eine Stickstoff-Bestimmung.

4,372 mg Subst., 6,865 mg CO_2, 1,520 mg H_2O
$C_8H_8O_4N_4$ (224) Ber. C 42,85 H 3,57
Gef. C 42,82 H 3,89

Nach der Übereinstimmung im Schmelzpunkt und Analyse ist die flüchtige Substanz mit Acetaldehyd identisch.

Hochvakuumspaltung.

1,6124 g Calotoxin wurden in einem kleinen Destillierkölbchen im Hochvakuum (besser als 0,03 mm) bei 150° etwa zwei Stunden getrocknet. 1,5% Feuchtigkeitsverlust. Dann wurde die Temperatur rasch bis 240–250° gesteigert. Das destillierte gelb-weiße Öl (0,109 g) erstarrte bald zu kleinen Nadeln. Ausbeute an Oxymethyl-Reduktinsäure etwa 35% des theoretischen Wertes (ausgerechnet bei der Titration mit Jod).

Bei diesen Spaltungen wurde ein mit Kohlensäure-Eis-Aceton gekühltes U-Rohr vor das Kölbchen geschaltet. In seinem ersten Knick schied sich gewöhnlich noch etwas kristallisierter Stoff ab. Die Titration mit Jodlösung gab jedesmal andere Werte (112, 148, 90, 91 statt 73), die jedoch dafür sprechen, daß es sich bei diesem Rohprodukt auch um Oxy-methyl-Reduktinsäure handelt. Dasselbe beweist der Ausfall der Eisenchlorid-Reaktion. In der tief gekühlten Zone des U-Rohrs konnte man Wasser als Abbauprodukt identifizieren: erstens durch die Blaufärbung von wasserfreiem Kupfersulfat und zweitens durch Bildung von Diphenylharnstoff (Schmp. 237–239°) aus Phenylcyanat.

Oxymethylreduktinsäure.

Das Destillat wurde aus Benzol unter Kohlensäure umkristallisiert, da die Substanz in Lösung leicht autoxydabel ist. Schmelzpunkt ohne Zersetzung 98–104°, der sich nach fünf Tagen im Exsiccator kaum geändert hat.

Zur Analyse wurde die Substanz unter Kohlensäure aufbewahrt und eingewogen:

4,458 mg Subst., 8,175 mg CO_2, 2,130 mg H_2O
$C_6H_8O_4$ (144) Ber. C 50,00 H 5,55
Gef. C 50,02 H 5,32

Die Oxymethylreduktinsäure ist schwach kongosauer, aber mit Natronlauge nicht titrierbar. Sie reduziert neutrale Silbernitrat-Lösung und Eisenchlorid-Lösung, mit der sie anfänglich eine violette

Färbung gibt. Die Säure wird von Jod zu der Triketoform oxydiert. 29,2 mg umkristallisierter Substanz wurden in wäßriger Lösung mit Stärkezusatz direkt titriert und verbrauchten 4,00 ccm n/10-Jodlösung. Berechnet auf 2 Mol-Verbrauch: Molekulargewicht 146 (Theorie 144).

Bestimmung der maximalen Ausbeute.

0,308 g getrocknetes Calotoxin wurde in der beschriebenen Weise gebrenzt und das gesamte Destillat in wäßriger Lösung mit Jodlösung titriert. Es verbrauchte 3,88 ccm 0,1n-Jodlösung entsprechend 27,94 mg Oxymethylreduktinsäure, d. s. 34,5% der theoretischen Menge.

Einwirkung von Brom.

27,2 mg umkristallisierte Oxymethylreduktinsäure wurde in Tetrachlorkohlenstoff-Lösung mit einer 1,36 N-Lösung von Brom titriert. Verbrauch 0,40 ccm, Äquivalent berechnet: 50. Außer der Oxydation hat wahrscheinlich Substitution in geringem Umfang stattgefunden.

In einem einzelnen Versuch, der mit überschüssigem Brom in Benzollösung ausgeführt war, wurden beim Eindunsten Kristalle erhalten. Die Wiederholung ist uns nicht gelungen.

Phloroglucid der Oxymethylreduktinsäure.

Zwei verschiedene Mutterlaugen der Oxymethylreduktinsäure haben wir mit Phloroglucin behandelt und fanden, daß sofort nach Erwärmung auf dem Wasserbad eine Trübung einsetzte, die bald zu braunen Flocken koagulierte. Diese ließen sich aus Essigester umkristallisieren. Bei 135° im Hochvakuum getrocknet, ergab die Substanz die folgende Analyse, die jedoch soviel Rückstand hatte, daß man eigentlich nur orientierenden Wert darauf legen kann:

4,707 mg Subst., 10,605 mg CO_2, 1,970 mg H_2O, 0,341 mg Rst.
$C_{12}H_{10}O_5$ (234) Ber. C 61,54 H 4,27
Gef. C 62,50 H 5,02

Abbau der Oxymethylreduktinsäure.

Umkristallisierte Oxymethylreduktinsäure aus 0,9084 g Calotoxin, entsprechend etwa 60 mg der Säure, wurde mit frischdestilliertem Diazomethan (Äther-Lösung) behandelt. Dabei traten Gasentwicklung und Entfärbung auf. Um die Methylierung von nur einer Hydroxylgruppe, gekennzeichnet durch eine grüne Farbreaktion mit Eisenchlorid, zu vermeiden, wurde ein Überschuß von Diazomethan gebraucht. Nach Eindampfen der Äther-Lösung bekommt man das Dimethyl-Derivat als ein gelbes Öl. Die Ozonisierung wurde in wäßriger

Lösung ausgeführt und es dauerte etwa fünf Minuten, bis das Ozon nicht mehr verbraucht wurde. Nach Einengen wurde die Lösung mit 5 ccm 0,1-Natronlauge eine Stunde auf einem Wasserbad erhitzt. Dann wurde die Lösung neutralisiert und mit fünf Tropfen Perhydrol behandelt. Nach Abfiltrieren der kleinen Menge brauner Flocken, die sich ausschieden, wurde die Lösung bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit Äther ausgezogen. Der ätherlösliche Teil wurde dann im Vakuum aus einem Metallbad destilliert. Aus dem hellen öligen Destillat kristallisierten in einigen Stunden feine Nadeln aus. Das Destillat hatte einen sehr starken, charakteristischen, obwohl unbekannten Geruch und reagierte stark sauer. Nach Abpressen auf Ton gaben die weißen Kristalle einen Schmelzpunkt von 95° (Schmp. Citraconsäure 91°).

Einwirkung von Säure auf Calotoxin.

1 N-Schwefelsäure: 100 mg Calotoxin wurde auf einem Wasserbad eine Stunde mit 5 ccm Alkohol und 5 ccm 2 N-Schwefelsäure erhitzt. Um das Calotoxin in Lösung zu bringen, mußte man noch 5 ccm Alkohol zugeben. Nach Einengen im Vakuum scheidet sich eine Substanz (90 mg) aus, die sich beim Umkristallisieren aus Aceton als Calotoxin herausstellte.

Konzentrierte Salzsäure: 50 mg Calotoxin wurde langsam und portionsweise in konzentrierte Salzsäure (etwa 12 N) eingerührt, die in einer Eis-Kochsalz-Mischung möglichst tief gekühlt war. Nach 15 Minuten wurde die Lösung ganz klar und war kaum stärker gefärbt als die reine Salzsäure. Die Lösung wurde dann auf Eis gegossen und es trat sofort eine Trübung ein. Nach Abfiltrieren und Umkristallisieren aus absolutem Alkohol bekam man eine Substanz vom Zersetzungspunkt 241°, deren Analyse auf Calotoxin stimmt. Die Substanz wurde bei 140° im Hochvakuum getrocknet:

2,606 mg Subst., 6,020 mg CO_2, 1,760 mg H_2O
Calotoxin $C_{29}H_{40}O_{10}$ (548,3) Ber. C 63,46 H 7,35
Gef. C 63,01 H 7,56

Starke Schwefelsäure: In derselben Weise wie mit konzentrierter Salzsäure wurde 50 mg Calotoxin mit konzentrierter Schwefelsäure (etwa 12 N) behandelt. Die Lösung färbt sich sofort rot. Nach 10 Minuten wurde die Lösung mit Eis verdünnt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösung hinterließ beim Abdampfen 40 mg gelbe Substanz, die nicht zu kristallisieren war.

Ein ähnlicher Versuch mit konzentrierter Schwefelsäure und 10% Wasser gab ebensowenig einen Erfolg.

Methylierung des Calotoxins.

Zu einer Alkohol-Chloroform-Lösung von 50 mg Calotoxin wurde eine frisch-destillierte Diazomethan-Lösung (Äther) zugegeben. Da weder Stickstoffentwicklung noch Entfärbung eintraten und die zurückgewonnene Substanz sich als Calotoxin verhielt, kann man mit Sicherheit sagen, daß Calotoxin, jedenfalls unter den obigen Umständen, mit Diazomethan nicht reagiert.

Wir haben dann versucht, eine Methylalkohol-Lösung des Calotoxins mit gasförmig eingeleitetem Diazomethan zu methylieren. Die Entfärbung des Diazomethans geschah rasch, aber wahrscheinlich war es nur die gewöhnliche Zersetzung des Diazomethans in einer Methylalkohol-Lösung. Nach Einengen und Umkristallisation bekam man eine Substanz, die wie Calotoxin schmolz und deren Mischschmelzpunkt damit keine Depression gab.

Oxim des Calotoxins.

Zu einer absolut-alkoholischen Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid und wasserfreiem Natriumacetat, die zuerst erhitzt und dann von dem unlöslichen Teil abfiltriert wurde, wurden 250 mg Calotoxin zugegeben. Die Lösung wurde zwei Stunden auf einem Wasserbad erhitzt. Nach starkem Einengen schied sich eine Substanz aus, die zur Entfernung der beigemischten Salze mit Wasser zerrieben und aus absolutem Alkohol zweimal umkristallisiert wurde. Zersp. 244°. Eine Stickstoff-Analyse zeigte nur eine Spur von Stickstoff.

Hydrierung.

0,1007 g Calotoxin in absolutem Alkohol mit Platinoxyd als Katalysator nahm in zwei Tagen 7,43 ccm Wasserstoff auf. (Ber. 1 Mol 3,08 ccm,) Da Calotoxin in reinen Lösungsmitteln so schwer löslich ist, haben wir dann 95,8 mg Calotoxin in 80% wäßrig-alkoholischer Lösung hydriert und fanden, daß es in 13 Stunden 7,81 ccm Wasserstoff aufnahm. (Ber. 1 Mol 4,3 ccm.) In beiden Fällen waren die Zersetzungspunkte der ausgeschiedenen Substanz etwas höher als der des Calotoxins, aber nach einmaliger Umkristallisation waren sie 242° und 243°, also innerhalb eines Grads identisch mit dem des Ausgangsmaterials. Die Legal-Probe der hydrierten Substanzen war negativ.

Selen-Dehydrierung.

10 g Rückstand der Hochvakuumspaltung wurde mit 10 g Selen 5 Stunden bei 260–280°, 60 Stunden bei 290–295° und 30 Stunden bei 315–320° erhitzt. Die erkaltete Masse wurde zweimal mit Benzol

ausgekocht und die Lösung durch eine lange Aluminiumoxyd-Säule chromatographiert. Der erste Teil zeigte eine hell-blaue Fluoreszenz unter der Quarzlampe. Diese Lösung wurde eingedampft und in einem einseitig geschlossenen Kugelrohr mit 5 Kugeln im Hochvakuum destilliert (0,9 g).

Fraktion I: Bei 242° destilliert. Kristallisiert mit einer grünen Fluoreszenz (wahrscheinlich von dem noch vorhandenen Selen). Sie ließ sich aus absolutem Alkohol umkristallisieren, Schmp. 140–145°. Die Substanz wurde im gewöhnlichen Vakuum bis 210° sublimiert und wieder aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Man bekam eine kleine Menge Substanz-Schmp. 185° und aus der Mutterlauge eine Substanz, die bei 190–200° schmolz.

Fraktion Ia: Entsprechend Fraktion I, aber aus dem zweiten Benzolextrakt der Selenrückstände. Bei Behandlung genau wie Fraktion I ließ sich eine Substanz gewinnen, die bei 170° sinterte und bei 190° schmolz. Die Substanz wurde nochmals sublimiert (190°) und ein Absorptions-Spektrum davon genommen. Nr. D (siehe nächste Seite).

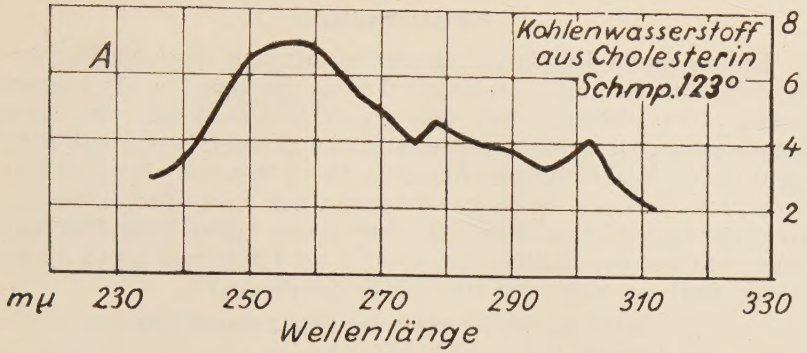
Fraktion II: 195°. Kristallisiert mit blauer Fluoreszenz. Diese Substanz gab bei der ersten Umkristallisation aus absolutem Alkohol Kristalle von Schmp. 97°. Sublimiert und wieder umkristallisiert. Die Kristalle sinterten bei 115° und schmolzen bei 135°. Nochmal sublimiert und Absorptions-Spektrum genommen. Nr. C.

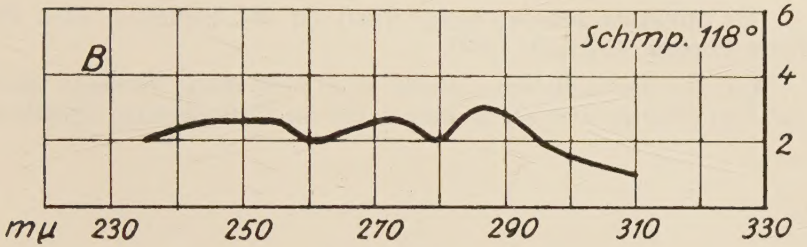
Fraktion III–IV: 190°. Nicht kristallisiert, aber blaue Fluoreszenz. Mehrmalige Destillation im Hochvakuum und Pikratversuch waren umsonst.

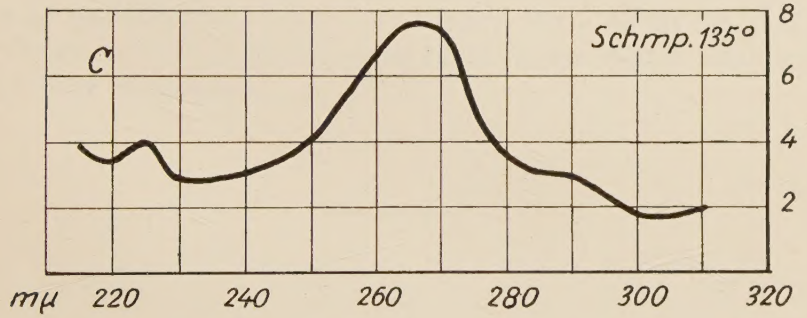
Fraktion V: Etwa 50°. Blaue Fluoreszenz, kristallisiert, aber sehr wenig. Nach nochmaligem Chromatographieren und Destillation dieses Teils zusammen mit der Mutterlauge von früheren kristallisierten Substanzen konnte man jedoch eine entsprechende Fraktion erhalten, die besser kristallisiert war und aus absolutem Alkohol in schönen glänzenden gelben Blättchen anfällt. Blaue Fluoreszenz. Reine Substanz 0,34 mg, Schmp. 118°. Absorptionsspektrum Nr. B

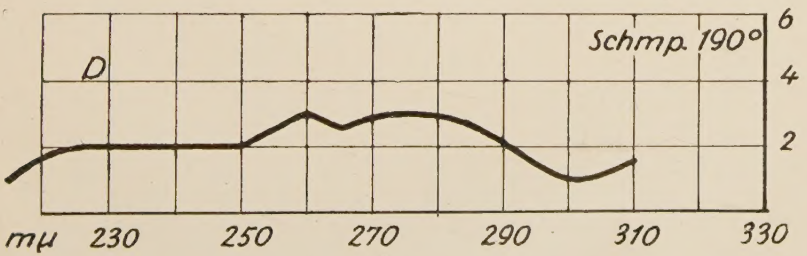
Schmp. Methyl-cyclo-penteno-Phenanthren aus Cholesterin . 123° Nr. A
Mischschmp. . . . . 108–115°

Die Absorptions-Spektren sind in einer 0,002%igen Ätherlösung gemessen.


A
Kohlenwasserstoff
aus Cholesterin
Schmp. 123°
8
6
4
2
mμ 230 250 270 290 310 330
Wellenlänge


B
Schmp. 118°
6
4
2
mμ 230 250 270 290 310 330


C
Schmp. 135°
8
6
4
2
mμ 220 240 260 280 300 320


D
Schmp. 190°
6
4
2
mμ 230 250 270 290 310 330

Chydenanthin

Es war zuerst die Absicht dieser Doktorarbeit, das von *Duyster*[5]) beschriebene Herzgift aus Chydenanthus Excelsus — das Chydenanthin — zu studieren. Aus der ersten Probesendung der Droge konnte es auch erhalten werden, aber die Hauptlieferung gab nichts mehr davon. Wahrscheinlich stammte dieses Material nicht von Chydenanthus Excelsus. Es ist uns gelungen, aus einem Petroläther-Extrakt der ersten Probe eine aus Alkohol sehr schön kristallisierende neue Substanz zu erhalten. Sie schmilzt bei 128,5° und ergab die folgende Analyse. (Getr. bei 100° im Hochvakuum.)

4,632 mg Subst., 12,865 mg CO_2, 2,69 mg H_2O
Gef. C 75,75 H 6,47 O 17,78
$C_{5,69}H_{5,78}O_1$

Das Molekulargewicht (nach Rast) ist 384. Vielleicht wäre die beste Formel: $C_{23}H_{24}O_4$ (364).

Aus der nachgelieferten Rinde war auch diese Substanz nicht mehr zu erhalten und wir mußten daher die Untersuchung aufgeben.

Literaturverzeichnis

1. *G. Hesse* und *F. Reicheneder:* Über das afrikanische Pfeilgift Calotropin I. Ann. 526, 252 (1936).

2. *G. Hesse, F. Reicheneder* und *H. Eysenbach:* II. Mitt. über afrikanische Pfeilgifte.

3. *Jacobs* und *Fleck:* J. Biol. Chem. 97, 57 (1932).

4. *Tschesche:* Ztsch. Physiol. Chem. 222, 58 (1937).

5. *M. Duyster:* Phytochemisch en Pharmacologisch Onderzoek van de Zaden van Chydenanthus Excelsus Miers.

Auch an dieser Stelle möchte ich nochmals meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater Herrn Dr. *Gerhard Hesse* für die mir stets erwiesene freundliche Beratung und Unterstützung meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 7. April 1915 wurde ich in Newark, N. J., U. S. A., als Sohn des Bauunternehmers Leon V. Heuser, geboren. Meine Schulausbildung erfolgte in Montclair, N. J. Im Juni 1932 erhielt ich dort mein Schulabgangszeugnis.

Vom September 1932 bis Juni 1936 war ich an der Universität Princeton, N. J. immatrikuliert. Als Hauptfach belegte ich Chemie und im Juni 1936 erwarb ich das "Bachelor of Arts" — Diplom.

Im Winter 1936/37 immatrikulierte ich mich dann an der Universität München und arbeitete das erste Semester unter Leitung von Herrn Geheimrat Professor Dr. *H. Wieland*. Im Herbst 1937 begann ich meine Doktorarbeit bei Herrn Dozent Dr. habil. *G. Hesse* und im Januar 1938 setzte ich die Arbeit an der Universität Marburg fort.

Ich brachte diese Arbeit im September 1939 zum Abschluß. Die zweite Verbandsprüfung habe ich im Juli 1939 abgelegt.